

Tarja Pitkänen
Seija Kalso
Asko Vepsäläinen
Jarkko Rapala
Seppo I. Niemelä

Colilert-menetelmän verifiointi sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 461/2000 mukaisiin koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin tutkimuksiin Suomessa

RAPORTTI



Tarja Pitkänen, Seija Kalso, Asko Vepsäläinen,
Jarkko Rapala, Seppo I. Niemelä

Colilert-menetelmän verifointi sosiaali- ja
terveysministeriön asetuksen 461/2000 mukaisiin
koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin
tutkimuksiin Suomessa



TERVEYDEN JA
HYVINVOINNIN LAITOS

RAPORTTI 17/2009

Tarja Pitkänen^{1,*}, Seija Kalso², Asko Vepsäläinen¹, Jarkko Rapala³ ja
Seppo I. Niemelä

¹ Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL), Vesi ja terveys -yksikkö, Kuopio

² MetropoliLab, Helsinki

³ Sosiaali- ja terveysalan lupa- ja valvontavirasto (Valvira), Helsinki

* Vertailukokeen koordinaattori. Puhelin 020 6106315, email tarja.pitkanen@thl.fi

© Kirjoittajat ja Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

Taitto: Christine Strid

ISBN 978-952-245-094-4 (PDF)

ISSN 1798-0089 (PDF)

Gummerus Kirjapaino Oy
Jyväskylä 2009

Tiivistelmä

Tarja Pitkänen, Seija Kalso, Asko Vepsäläinen, Jarkko Rapala, Seppo I. Niemelä. Colilert-menetelmän verifiointi sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen 461/2000 mukaisesti koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin tutkimuksiin Suomessa. Terveyden ja hyvinvoinnin laitos (THL), Raportti 17/2009. 35 sivua. Helsinki 2009.

Koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin (*E. coli*) määritykset ovat yleisin toimenpide Suomessa jaettavan talousveden mikrobiologisen laadun viranomaisvalvonnassa ja vesilaitosten suorittamassa käyttötarkkailussa. *E. coli* -bakteerin esiintyminen talousvedessä kertoo veden saastumisesta ja välittömästä terveysriskistä. Suomen viranomaisvalvonnassa on aiemmin hyväksytty standardimenetelmät SFS-EN ISO 9308-1 ja SFS 3016. Tässä hankkeessa testattiin Colilert®-18 Quanti-Tray -menetelmän (IDEXX Laboratories) luotettavuutta ja soveltuvuutta *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien tutkimiseen talousveden laadun viranomaisvalvonnassa Suomessa. Hankkeessa analysoitiin syksyllä 2008 yhteensä 94 koliformisia bakteereita sisältävää näytettä, joista yhteensä 65 näytteessä havaittiin myös *E. coli* -bakteeria. Colilert-menetelmän kaikki alustavat koliformiset bakteerit varmistuivat koliformisiksi bakteereiksi ja kaikki alustavat *E. coli* -havainnot varmistuivat *E. coli* -bakteereiksi. Referenssimenetelmässä SFS-EN ISO 9308-1 alustavista pesäkkeistä varmistui koliformisiksi bakteereiksi noin 78 % ja *E. coli* -bakteereiksi 28 %.

Tämän hankkeen verifiointiaineiston perusteella Colilert-menetelmä antoi noin 57 % suurempia koliformisten bakteerien tuloksia kuin referenssimenetelmä. *E. coli* -tulosten osalta Colilert-menetelmän saanto suhteessa referenssimenetelmään oli riippuvainen vertailussa käytetyistä näytetyypeistä: jätevedellä siirrostettuja näytteitä käytettäessä Colilert-menetelmä osoittautui paremmaksi kuin ISO 9308-1 -menetelmä, kun taas pinta- ja kaivosvesillä siirrostettuja näytteitä tutkittaessa tulos oli päinvastainen. Colilert-menetelmä antoi tässä verifiointissa keskimäärin 28 % suurempia *E. coli* -tuloksia kuin referenssimenetelmä SFS-EN ISO 9308-1, kun varmistuskriteerinä pidettiin indoli- ja β -glukuronidaasipositiivisuutta. Koska Colilert-menetelmä antaa keskimäärin suurempia tuloksia kuin referenssimenetelmä sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin testauksessa, Colilert-menetelmää voidaan pitää vähintään yhtä luotettavana menetelmänä kuin referenssimenetelmä. Työryhmä suosittaa täten Colilert-menetelmää vaihtoehtoiseksi menetelmäksi standardimenetelmien SFS-EN ISO 9308-1 ja SFS 3016 rinnalle talousveden viranomaisvalvontaan Suomessa.

Colilert-menetelmän käyttö, olipa kysymys sitten veden laadun viranomaisvalvonnasta tai käyttötarkkailusta, tuo merkittävää ajan säästöä niissä tilanteissa, joissa on aiheutta epäillä veden mikrobiologista saastumista. Colilert-menetelmää käytettäessä sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin tulokset valmis-

tuvat 18 tunnin kuluttua analyysin aloittamisesta. Voimakkaan ulostesaastumisen yhteydessä alustavat viitteet näistä mikrobeista voidaan saada tällä menetelmällä jo muutamien tuntien kuluttua analyysin aloittamisesta. Nopeuden tärkeys korostuu niissä tilanteissa, kun tehdään päätöksiä vedenkäytön rajoituksista ja veden puhautauden varmistavista toimenpiteistä.

Colilert-menetelmää käytettäessä on otettava huomioon, että tässä verifiointissa todettu vastaavuus pätee nimenomaan Colilert®-18 -reagenssia käytettäessä inkubointiolosuhteiden ollessa (36 ± 2) °C, 18–21 tuntia. Virhenegatiivisten *E. coli* -tulosten välttämiseksi fluoresenssireaktion lukeminen on suoritettava erityisessä lukukammiossa tai pimiössä ja vähäininkin fluoresenssi on tulkittava positiiviseksi reaktioksi. Colilert-menetelmää käytettäessä on myös huomioitava, että se antaa standardimenetelmiä SFS-EN ISO 9308-1 ja SFS 3016 useammin koliformisten bakteerien osalta positiivisia tuloksia.

Avainsanat: Colilert, *Escherichia coli*, koliforminen bakteeri, talousvesi

Sisällys

Tiivistelmä

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | TAUSTAA | 7 |
| 2 | TYÖN TOTEUTUS..... | 9 |
| 2.1 | Työryhmä..... | 11 |
| 2.2 | Näytteiden hankinta ja siirrostukset | 11 |
| 2.3 | Verrattavat menetelmät..... | 12 |
| | Tarvikkeet | 13 |
| | Suoritus | 13 |
| | Varmistustestit..... | 14 |
| | Laadunvarmistus..... | 15 |
| 2.4 | Tulosten käsittely | 16 |
| | Tulosten laskenta..... | 16 |
| | Tilastollinen käsittely..... | 17 |
| 3 | TULOKSET..... | 18 |
| 3.1 | Aineisto | 18 |
| 3.2 | Menetelmien herkkyys..... | 20 |
| 3.3 | Colilert-18 – ISO 9308-1 vertailu | 22 |
| | Koliformiset bakteerit | 22 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 24 |
| 3.4 | Suomen verifiointitulokset suhteessa Espanjan ja Ison-Britannian aiempiin tuloksiin | 29 |
| 4 | TULOSTEN TARKASTELU..... | 31 |
| 5 | JOHTOPÄÄTÖKSET | 33 |
| | Kirjallisuus | 34 |

1 TAUSTAA

Euroopan unionin neuvoston direktiivi 98/83/EY ihmisten käyttöön tarkoitettun veden laadusta tuli voimaan 25.12.1998. Suomessa direktiivi on saatettu voimaan sosiaali- ja terveysministeriön asetuksella 461/2000. Asetuksen mukaisesti koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin määritykset ovat yleisin toimenpide Suomessa jaettavan talousveden mikrobiologisen laadun viranomaisvalvonnassa. Esimerkiksi vuonna 2006 Suomessa mitattiin näitä molempia muuttujia noin 10 000 talousvesinäytteestä (Laboratorioselvitys, 2008).

Koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin määrittämismenetelmäksi viranomaisvalvonnassa on direktiivin mukaisesti säädetty standardin SFS-EN ISO 9308-1 mukainen kalvosuodatusmenetelmä, jossa viljelyalustana käytetään LTTC-Tergitol-agaria. Menetelmän käytössä on havaittu kuitenkin ongelmia, koska etenkin desinfiomattomilla vesillä taustakasvu häiritsee merkittävästi maljojen luettavuutta.

Direktiivin mukaan vaihtoehtoisia määrittämismenetelmiä voidaan käyttää sillä edellytyksellä, että saadut tulokset ovat vähintään yhtä luotettavia kuin käytettäviksi määritellyillä menetelmillä saadut tulokset. Vaihtoehtoisten menetelmien käytön mahdollistamiseksi Suomessa lähdettiin mukaan Ruotsin Elintarvikeviraston vetämään vaihtoehtoisten menetelmien vertailututkimukseen vuonna 2003. Tutkimuksen seurauksena STTV antoi ohjeen, jonka mukaan säädetyn menetelmän lisäksi voidaan käyttää Les Endo -alustan käyttöön pohjautuvaa menetelmää SFS 3016 (Ohje Dnro 240/72/04, 31.5.2004).

Jo tuolloin haluttiin hyväksyä myös Colilert®-18 Quanti-Tray -menetelmä (IDEXX Laboratories) yhdeksi vaihtoehdoista, koska sen tiedettiin olevan huomattavasti edellä mainittuja standardimenetelmiä nopeampi menetelmä. Nopeuden merkitys korostuu niissä tilanteissa, jolloin vedestä todetaan alustavasti koliformisia bakteereita tai *E. coli* -bakteeria. Standardimenetelmillä tulos ja siten *E. coli* -bakteerin löydös varmistuvat vasta useiden päivien kuluttua, kun taas Colilert-menetelmällä varmistettu tulos saadaan samassa yhteydessä kuin alustava tulos em. menetelmillä. Vuoden 2003 vertailututkimuksen tulosten, Suomen aiemmin EY:n komissiolta saaman kielteisen päätöksen ja silloisten menetelmällisten tietojen valossa Colilert-menetelmän hyväksyntää vaihtoehtoiseksi menetelmäksi viranomaisvalvontaan ei kuitenkaan voitu tehdä, vaan päätettiin jäädä odottamaan eräiden muiden EU:n jäsenmaiden, kuten Saksan päätösten käsittelyä EY:n komissiossa. Vaikka viranomaishyväksyntää ei voitu tehdä, epidemioiden ja vesiongelmiin selvityksissä on kuitenkin Suomessakin suositeltu käytettäväksi uusintänäytteen tutkimiseen hyväksytyjen menetelmien rinnalla nopeampia menetelmiä, kuten Colilert-menetelmää.

Vuoden 2003 jälkeen on saatu uutta tietoa muissa Euroopan maissa tehtyjen vertailututkimusten perusteella. On mm. havaittu, että vuoden 2003 tutkimuksen varmistustestit väärien positiivisten rajaamiseksi olivat puutteelliset ja lisäksi Es-

panjassa ja Isossa-Britanniassa on tehty ja kattavasti raportoitu tutkimuksia, joiden loppupäätelmänä Colilert-menetelmä on voitu hyväksyä noissa maissa käytettäväksi. Näiden uusien tietojen innoittamana tässä tutkimuksessa haluttiin verifioida Colilert-menetelmä talousveden viranomaisvalvontaan hyväksyttäväksi vaihtoehtoiseksi menetelmäksi Suomessa.

Työn tarkoituksena oli tehdä yhden laboratorion verifointi Colilert-menetelmän soveltuvuudesta käytettäväksi Suomen talousvesien viranomaisvalvonnassa koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin analytiikassa vaihtoehtoisena menetelmänä. Tässä raportissa esitetyn aineiston perusteella voidaan antaa kansalliset ohjeet vaihtoehtoisesta menetelmästä ja laatia talousvesidirektiivin vaatimusten täyttämiseksi komissiolle toimitettava raportti. Raportin on sisällettävä kaikki asiaankuuluvat tiedot Suomessa käytetyistä menetelmistä ja niiden vastaavuudesta.

2 TYÖN TOTEUTUS

Hankkeessa testattiin Colilert-menetelmää koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin määrittämiseksi talousvedestä. Työ suoritettiin menetelmien vastaavuuden testaamiseksi standardissa SFS-EN ISO 17994 annettujen kriteereiden mukaisesti. Referenssimenetelmänä, johon vaihtoehtoista menetelmää verrattiin, käytettiin kalvosuodatusmenetelmää SFS-EN ISO 9308-1 perustuen LTTC Tergitol -alustan käyttöön (LTTC).

Työssä hyödynnettiin aikaisemmin eri Euroopan maissa tehtyjä vertailututkimuksia, joiden tuloksien yhtäpitävyyttä Suomen vesillä verifioitiin tässä tutkimuksessa yhden laboratorion tuottaman aineiston avulla. Tällainen menettelytapa on todettu mahdolliseksi eurooppalaisessa vesimikrobiologian asiantuntijaryhmässä (EMAG/EGM Guidance Note, 2005) vastaavuusstandardin SFS-EN ISO 17994 kohdan 5.3.8 mukaisesti. Verifiointiin tarvittava näytemäärä laskettiin aikaisempien vertailujen suhteellisten erotusten keskiarvosta ja keskihajonnasta standardin antamalla kaavalla.

Pohja-aineistona tässä hankkeessa käytettiin Espanjan vuonna 2007 raportoimaa vertailututkimusta, joka suoritettiin 256 näytteellä ja jonka tuloksena todettiin Colilert-menetelmän antavan koliformisten bakteerien osalta 66 % korkeampia tuloksia kuin referenssimenetelmä LTTC. *E. coli* -bakteerin osalta espanjalaisessa tutkimuksessa saatiin kahdenlaisia tuloksia riippuen siitä, mitä varmistustestikriteeriä käytettiin. Jos kriteerinä pidettiin indolipositiivisuutta, Colilert antoi 24 % alhaisempia tuloksia kuin LTTC. Sen sijaan, jos kriteerinä pidettiin β -glukuronidaasipositiivisuutta (MUG+), Colilert antoi 22 % korkeampia tuloksia kuin LTTC. Suomen aineistoa verrattiin myös Ison-Britannian vertailututkimuksen tuloksiin, joiden mukaan Colilert antoi 79 % korkeampia koliformisten bakteerien pitoisuuksia kuin LTTC. *E. coli* -bakteerin osalta Ison-Britannian aineistolla Colilert antoi 23 % korkeampia tuloksia kuin LTTC. Tutkimuksessa tutkittiin noin 450 näytettä, joista suuri osa oli jokivesiä.

Taulukossa 1 on esitetty tarvittavat näytemäärät Espanjan ja/tai Ison-Britannian tulosten verifioimiseksi. Koska Colilert-menetelmällä todetaan merkittävästi enemmän koliformisia bakteereita kuin LTTC-menetelmällä, tämän tuloksen verifioimiseksi olisi laskennallisesti riittänyt alle 10 kpl näytteitä. Sen sijaan *E. coli* -bakteerin osalta verifiointi on hankalampi, koska erot ovat pienemmät ja varmistustesteistä riippuen tulos voi olla erilainen. Osittainen varmistus lisäksi kasvattaa aineiston hajontaa. Täten *E. coli* -bakteerin osalta verifiointiin tarvitaan noin 90 kpl näytteitä.

TAULUKKO 1. Verifiointiin tarvittavat näytemäärät, kun epävarmuuden suurin hyväksytyt poikkeama nol-
lasta (D) on 10 % ja laskennassa huomioidaan varmistetut tulokset.

| | Koliformiset bakteerit | | <i>E. coli</i> | |
|--------------------------|---|---|--|---|
| | Vertailun tulos: suhteellisten erotusten keskiarvo (s) | Verifiointiin tarvittava näytemäärä (kpl) | Vertailun tulos: suhteellisten erotusten keskiarvo (s) | Verifiointiin tarvittava näytemäärä (kpl) |
| Espanjan aineisto | 66.1 (71.8) | 5 | IND+: | 54 |
| | | | -38.2 (103.2) | |
| Ison-Britannian aineisto | 79.1 (106.2) | 7 | MUG+: | 82 |
| | | | 20.7 (101.8) | |
| | | | 23.5 (106.2) | |

s = suhteellisen erotuksen keskihajonta.

Työ toteutettiin yhteistyössä suomalaisten vesimikrobiologian alan toimijoiden kesken. Työn suunnittelusta, koordinoinnista, aineiston käsittelystä ja raportoinnista vastasi Terveiden ja hyvinvoinnin laitos (entinen Kansanterveyslaitos), joka on Colilert-menetelmän osalta jo aikaisemmin koordinoitunut Suomessa vuonna 2003 yhdessä ruotsalaisten tahojen kanssa toteutetun talousvesien menetelmävertailun ja vuonna 2006 toteutetun suomalaisten uimavesien *E. coli* -menetelmävertailun. Näyttemateriaalin hankinnasta ja analysoinnista vastasi MetropoliLab (ent. Helsingin kaupungin ympäristökeskuksen laboratorio), jolla on työhön vaadittava akkreditointi ko. menetelmille ja joka Colilert-menetelmän osalta osallistui jo 1990-luvun lopulla eurooppalaiseen menetelmävertailututkimukseen ja lisäksi vuoden 2006 uimavesivertailuun.

Muut työryhmän jäsenet ja yhteistyötahot tukivat ja ohjasivat hankkeen toteutusta. Aineiston tilastollista käsittelyä ohjasi emeritus Seppo I. Niemelä, joka on viime vuosina vastannut menetelmävertailuaineistojen käsittelystä Euroopassa ja joka on valmistellut menetelmien vastaavuusstandardin SFS-EN ISO 17994. Valvira (entinen STTV) osallistui työn suunnitteluun ja raportointiin vastaten myös vaihtoehtoisten menetelmien kansallisesta hyväksymisestä ja tuloksista tiedottamisesta yhdessä sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön kanssa.

Tavoitteena oli tuottaa noin 90 vertailukelpoista näytettä sisältäen kloorattuja ja klooraamattomia talousvesiä, luontaisesti kontaminoituneita raakavesiä ja pintavedellä sekä jätevedellä ympäröityjä talousvesiä. Näytteet tutkittiin rinnakkain Colilert-menetelmällä ja LTTC-alustalla. Alustavia löydöksiä (koliformiset bakteerit ja *E. coli*) pyrittiin varmistamaan resurssien sallimissa rajoissa mahdollisimman paljon molemmilla menetelmillä. Varmistuksissa keskityttiin *E. coli* -bakteeriin, koska jo ennen hankkeen aloittamista on selvää, että Colilert-menetelmällä todetaan enemmän koliformisia bakteereita kuin LTTC-alustalla. Varmistukset suoritettiin

viljelemällä ensin puhdasviljelmä Chromocult Coliform Agarille ja/tai tryptoni-soija-agarille, jonka jälkeen tehtiin varmistustesteinä oksidaasitesti ja Fluorocult LSB-liemitestit. Lisäksi osalle kannoista tehtiin gramvärjäys. Varmistustesteissä epäselviä reaktioita antaneet kannat jatkotyypitettiin *Uid-Lac* PCR-menetelmällä (Bej *et al.*, 1991).

Aineiston hankinta ja analysointi sekä muut käytännön laboratoriotyöt tehtiin loka-marraskuussa 2008. Aineiston tilastollinen käsittely aloitettiin tämän jälkeen joulukuussa 2008. Tämän raportin perusteella voidaan tehdä kansalliset päätökset menetelmän hyväksymisestä. Laboratoriotöihin liittyvät jatkoselvitykset ja Euroopan komissiolle toimitettava raportti viimeistellään vuoden 2009 loppuun mennessä.

2.1 Työryhmä

Tämän menetelmien vertailututkimuksen suunnittelusta, toteutuksesta ja raportoinnista vastasi työryhmä, joka koostui osallistuvan laboratorion ja kansallisten viranomaistahojen edustajista. Työryhmään kuului myös tilastollinen asiantuntija.

Työryhmä

Tutkija Tarja Pitkänen, THL, tarja.pitkanen@thl.fi

Toimitusjohtaja, mikrobiologi Seija Kalso, MetropoliLab, seija.kalso@hel.fi

Emeritus Seppo Niemelä, Helsingin yliopisto, sam.niemela@kolumbus.fi

Tutkija Asko Vepsäläinen, THL, asko.vepsalainen@thl.fi

Ylitarkastaja Jarkko Rapala, Valvira, jarkko.rapala@valvira.fi

Muut yhteistyötahot

Sosiaali- ja terveysministeriö (yhteyshenkilö neuvotteleva virkamies Jari Keinänen)

Vesihuoltolaitosten kehittämisrahasto (yhteyshenkilö vesihuoltoinsinööri Riina Liikanen)

Helsingin Vesi (yhteyshenkilö mikrobiologi Tuula Laakso)

Berner Oy, Terveys ja Tutkimus (yhteyshenkilö avainasiakaspäällikkö Aimo Savolainen)

2.2 Näytteiden hankinta ja siirrostukset

Tavoitteena oli tutkia niin monta näytettä, että raportointikelpoisia näytteitä kertyy koliformisten bakteerien osalta vähintään 30 kappaletta (laskennallista määrää 10 kpl pidettiin liian vähäisenä). *E. coli* -bakteerin osalta pyrittiin noin 90 näytteen tutkimiseen. Verrattavat analyysit tehtiin aina samasta näytepullosta. Tutkittavana tilavuutena käytettiin 100 ml näytevettä molemmilla menetelmillä. Tavoitepitoisuutena oli noin 5–20 positiivista kuoppaa (Colilert) ja pesäkettä (LTTC) tutkimus-

sa tilavuudessa. Koska tällaisia pitoisuuksia ei luontaisesti ole vesilaitosvesissä, so-
pivaan positiivisten määrään tähdättiin siirrostusten avulla.

Näytteinä käytettiin MetropoliLabiin saapuneita ja kerättyjä kloorattuja ja kloo-
raamattomia talousvesiä, joita terästettiin jätevesillä ja pintavesillä. Tutkimuksessa
käytettiin myös luontaisesti kontaminoituneita pintavesiä. Liian paljon bakteereita
sisältäneet näyte-erät hylättiin liian suuren työtaakan vuoksi. Myös sellaiset näyt-
teet, joissa molemmat testattavista menetelmistä eivät antaneet yhtään positiivista
kuoppaa/pesäkettä, hylättiin.

Tuntemattomia näytteitä tutkittaessa meneteltiin siten, että siirrostetusta näyt-
teestä tehtiin ensin analyysi vain Colilert-menetelmällä. Seuraavana päivänä saadut
alkutestauks tulokset kirjattiin ja niiden perusteella päätettiin, onko näyte kelvollinen
vertailuun sellaisenaan. Mikäli näyte oli kelvollinen (ts. tulos noin 5–20 MPN/ 100
ml *E. coli*-bakteeria), analysoitiin näyte uudelleen käyttäen vertailussa mukana olevia
menetelmiä. Vertailuun kelvollinen Colilert -analyysi tehtiin uudestaan aloittamalla
se samanaikaisesti referenssimenetelmän (ISO 9308-1) kanssa; hylätäänkö näyte.

Koliformisten bakteerien osalta oli hankalaa saada sellaisia edustavia näytteitä,
joissa olisi myös *E. coli*-bakteeria. Tämän vuoksi analysoitiin edellä kuvattujen 5–20
MPN/100 ml *E. coli*a sisältävien näytteiden lisäksi vain koliformisia bakteereita 5–20
MPN/100 ml sisältäviä näytteitä.

2.3 Verrattavat menetelmät

Tässä tutkimuksessa referenssimenetelmän SFS-EN ISO 9308-1 (LTTC) tuottamia
koliformisten ja *E. coli* –bakteerien tuloksia verrattiin mahdollisen vaihtoehtoisen
menetelmän Colilert Quantitray antamiin koliformisten ja *E. coli* –bakteerien tu-
loksiin. SFS-EN ISO 9308-1 menetelmässä koliformisten bakteerien havaitseminen
perustuu laktoosipositiivisuuteen (värimuutos elatusaineessa) ja oksidaasinegatii-
visuuteen. *E. coli* -bakteerin havaitseminen ko. elatusaineella perustuu lisäksi bak-
teerin kykyyn tuottaa tryptofaanista indolia + 44 °C:ssa. Vaihtoehtoisessa Colilert-
menetelmässä koliformisten bakteerien havaitseminen perustuu kromogeeniseen
reaktioon. *E. coli* -bakteerin havaitseminen perustuu fluorogeeniseen reaktioon si-
ten, että positiivinen *E. coli* -tulos Colilert-menetelmällä vaatii sekä kromogeeni-
sen (koliformi) että fluorogeenisen reaktion tapahtuneeksi ja havaituksi samassa
kaivossa.

Tarvikkeet

IDEXX 98-08876-00 Colilert-18 reagenssi
IDEXX 98-21378-00 Quanti-tray liuskat
IDEXX 98-21904-00 Antifoam
IDEXX 100 ml:n pullot
Merck 1.12588.0500 Lauryl Sulfate Fluorocult
Merck 1.10426.0500 Coliform Agar Chromocult
Oxoid CM0793 Tergitol-7 agar
Oxoid SR0148A, TTC 0,125 % Supplement
Merck 1.05458.0500 Tryptic Soy agar
Kovac'sin reagenssi, ProLab
Oksidaasireagenssi, BD Oxidase Reagent Droppers, suodatinpaperi
Gramvärjäysliuokset, BD Gram Stainig Kit
BD BBL Gram Slide
Valomikroskooppi
Steriilejä pipetinkärkiä
Automaattipipetit
UV-lukukammio (vaihtoehtoisesti pimiö, tehokas UV-lamppu ja suojalasit)
Colilert sulkijalaite
Tyhjiä petrialjoja (halkaisija 60 mm ja 90 mm)
0,45 µm kalvosuodattimia (EZ-Pak, Millipore EZHAWG474)
Koeputkia korkkeineen
Durham –putkia
Koeputkitelineitä
Steriloituja Eppendorf tai vastaavia putkia (esim. á 0,5 ml tilavuudeltaan)
Steriilejä neuloja ja ruiskuja (esim. 1 ml:n insuliiniruisku)
Kertakäyttöisiä viljelysauvoja ja -silmukoita
Inkubaattorit 36 ± 2 °C ja 44 ± 0,5 °C
Vesihaude 45 ± 1°C

Suoritus

Työssä kiinnitettiin huomiota työjärjestykseen. Joka toisella näytteellä ensin suoritettiin referenssimenetelmä (9308-1) ja joka toisella näytteellä ensin tehtäväksi tuli vaihtoehtomenetelmä (Colilert). Analyysit suoritettiin laboratoriossa verrattavilla menetelmillä kustakin tutkittavasta näytteestä välittömästi peräkkäin, ilman minkäänlaisia taukoja. Inkuboinnit aloitettiin yhtä aikaa, välittömästi suodatuksen (9308-1) ja liuskan (Colilert) sulkemisen jälkeen.

ISO 9308-1: 100 ml näytettä (samasta pullosta kuin Colilertiä varten; siirrostettu) suodatettiin kalvolle (0,45 µm) ja kalvo asetettiin LTTC-maljalle (47 mm). Inkubointi (36 ± 2) °C:ssa (21 ± 3) tuntia.

Colilert: 100 ml näytettä (samasta pullosta kuin referenssimenetelmää varten; siirrostettu) lisättiin Colilert-reagenssi, antifoam-tipat ja sekoitettiin. Quantitray täytettiin, suljettiin ja inkuboitiin (36 ± 2) °C:ssa 18–21 tuntia. Huom. Vertailussa käytettiin ainoastaan 51-kaivoisia liuskoja.

Inkuboinnin jälkeen laskentatulokset kirjattiin laskentalomakkeeseen.

Varmistustestit

Aluksi sekä Colilert-liuskoilta että LTTC-alustoilta varmistettiin kaikki alustavat kuopat/pesäkkeet (sekä koliformi että *E. coli*), kunnes varmistuksia oli kertynyt arviolta noin 1000 kannasta. Tämän jälkeen aloitettiin osittainen varmistus, jossa sekä Colilert-liuskoilta että LTTC-alustoilta kaikki tai vähintään 10 kpl alustavia kuoppia/pesäkkeitä otettiin jatkoihin. Tämän jälkeen työtä vielä jatkettiin siten, että osittainen varmistus tehtiin ainoastaan LTTC-alustoilta (raportoitiin vain alustavat Colilert tulokset).

Osittaista varmistusta käytettäessä pesäkkeiden ottaminen jatkoon satunnaisesti. Colilertilta satunnaistaminen toteutettiin siten, että aloitettiin keltaisten ja keltaisten + fluoresoivien kaivojen poimiminen liuskan vasemmasta alakulmasta ja otettiin sieltä lukien järjestyksessä vähintään 10 kpl jatkoihin. LTTC alustalla satunnaistaminen toteutettiin siten, että kalvon laidasta, ensimmäisestä kokonaisesta ruudusta alkaen, maljan pohjaan piirrettiin viiva, josta alkaen kaikki tyyppilliset (keltaiset) pesäkkeet kerättiin järjestyksessä jatkoihin, kunnes vähintään 10 kpl oli poimittu.

Varmistukset koostuivat seuraavista vaiheista:

- Puhdasviljelmä Chromocult-alustalle (vain Colilert)
- Puhdasviljelmä TSA-alustalle
- Oksidaasitesti
- Fluorocult-testi + 44 °C (kasvu, indoli, fluoresenssi ja kaasu)
- Mahdollinen kantojen talteenotto ja edelleen lähetys

Lisäksi yhdeksästä TSA:lle LTTC-maljalta ensimmäiseksi poimitusta kannasta testattiin Gramreaktio, mikäli kanta oli oksidaasinegatiivinen. Testauksia suoritettiin viljelmistä siihen saakka, kunnes niitä oli kertynyt 261 kpl (kattaa testinumerot 1–30).

Tiedot varmistustesteihin otettavista pesäkkeistä ja varmistustestitulokset kirjattiin varmistustestilomakkeeseen. Testattavien kantojen puhtauteen kiinnitettiin huomiota ja pyrittiin tekemään jatkoviljelmät erillispesäkkeestä. Mikäli oli aihetta

epäillä sekakasvua tai alustalta ei ollut mahdollista saada erillispesäkkeitä jatkoon, kannat viljeltiin puhtaaksi uudelle alustalle.

Koliformiseksi bakteeriksi tulkittiin varmistustestissä oksidaasinegatiivinen kanta, joka alun perin oli Colilert-liuskalla keltainen tai keltainen+fluoresoiva ja LTTC-alustalla keltainen.

E. coli -bakteereiksi tulkittiin koliformiset bakteerit, jotka olivat indoliposiitivisia (IND+). Vaihtoehtoisena varmistuskriteerinä käytettiin positiivista fluoresenssireaktiota Fluorocult-putkessa (MUG+) ja kaasun tuottoa. Taulukossa 2 on esitetty mahdolliset varmistustestien tulosityhdistelmät (1–8).

TAULUKKO 2. Mahdolliset varmistustestien tulosityhdistelmät

| | | | |
|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
| 1 | Oks-, IND44+, MUG44+ ja GAS44+ | 5 | Oks-, IND44-, MUG44+ ja GAS44+ |
| 2 | Oks-, IND44+, MUG44+ ja GAS44- | 6 | Oks-, IND44-, MUG44+ ja GAS44- |
| 3 | Oks-, IND44+, MUG44- ja GAS44+ | 7 | Oks-, IND44-, MUG44- ja GAS44+ |
| 4 | Oks-, IND44+, MUG44- ja GAS44- | 8 | Oks-, IND44-, MUG44- ja GAS44- |

Varmistetuiksi *E. coli* -bakteereiksi tulkittiin automaattisesti ne kannat, jotka olivat olleet oksidaasinegatiivisia, indoliposiitivisia ja fluoresoineet Fluorocult-putkissa, eli vaihtoehdot 1 ja 2. Kaasunmuodostus + 44 °C:ssa ja sinivioletti väri Chromocult-alustalla tukivat tätä tulkintaa, mutta eivät olleet edellytyksenä *E. coli* -bakteeriksi tulkitsemiselle. Vaihtoehtojen 3–7 mukaiset kannat lähetettiin MetropoliLabista jatkotutkimuksiin Terveiden ja hyvinvoinnin laitokseen (ent. Kansanterveyslaitos).

Laadunvarmistus

MetropoliLabissa on akkreditoituna vertailussa käytetyt menetelmät ja varmistusmenettelyt ovat olleet aiemmin käytössä uimavesiä koskeneessa vertailussa kesällä 2006.

Vertailussa käytettävät Colilert- ja LTTC-reagenssierät testattiin ennen työn aloittamista tunnetulla näytteellä. Vertailussa käytetyn Colilert-reagenssierän toimivuus varmistettiin tunnetun pitoisuuden omaavalla näytteellä ennen työn aloittamista. Näytteessä oli positiivisena testiorganismina *Escherichia coli* ATCC 25922 ja negatiivisena testiorganismina *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Jokainen LTTC-elatusaineen laboratorion valmistuserä varmistettiin kvantitatiivisesti positiivisena testikantana *Escherichia coli* ATCC 25922 ja negatiivisena *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Varmistustesteissä käytettyjen elatusalustojen (Chromocult, Fluorocult) jokainen valmistuserä testattiin ennen käyttöä tunnetulla koliformisella bakteerikannalla *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 ja *Escherichia coli* ATCC 25922 -kannalla sekä 36 että 44 °C:ssa. Yleiselatusaineen (TSA) kasvatuskyky testattiin *Escherichia coli* ATCC 25922 ja *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 -testikannoilla.

Gramvärjäyksessä jokaisessa objektilasissa oli yhdeksän kantaa ja yksi kaupallinen kontrolli (*E. coli* ATCC 25922 ja *S. aureus* ATCC 25923).

2.4 Tulosten käsittely

MetropoliLab tallensi tuottamansa raportointikelpoiset tulokset tulostiedostoon ja lähetti nämä tiedostot sekä kopiot laboratorioissa täytetyistä laskenta- ja varmistustestilomakkeista hankkeen koordinaattorille.

Tulosten laskenta

Menetelmien vertailussa tarvittavien testimuuttujien laskemiseksi havainnoista laskettiin jokaisessa näytteessä erikseen varmistetut tulokset kaavalla

$$(1) \quad P_{pos} = F \cdot \frac{K}{N}$$

P_{pos} = alustavasti positiivisten varmistettu määrä

F = alustavasti positiivisten lukumäärä

K = varmistuneiden lukumäärä

N = onnistuneesti varmistukseen eristettyjen lukumäärä

Nämä laskut tehtiin erikseen Colilert- ja LTTC-menetelmille sekä koliformisille bakteereille että *E. coli* -bakteerille. Colilert-menetelmällä keltaisista+fluoresoivista ja vain keltaisista saadut tulokset laskettiin erikseen ennen yhdistämistä lopulliseen tulokseen.

Colilert-menetelmässä, joka on MPN-menetelmä, positiivisten lukumäärät muunnettiin mikrobipitoisuudeksi kaavalla

$$(2) \quad A = 51 \times \ln [51 / (51 - P)]$$

A = Colilert-tulos 100 ml kohti (kokonaisen tarkkuudella)

P = positiivisten kasvukenttien (F tai P_{pos}) lukumäärä

Menetelmien ISO 17994 standardin mukaista vertailua varten muodostettiin testi-suure: *suhteellinen erotus* (x), tavoitteesta riippuen joko alustavista tai varmistetuis-

ta Colilert-tuloksista (A). ISO 9308-1 referenssimenetelmässä käytettiin vain varmistettuja tuloksia (R).

$$(3) \quad x_i = 100 \cdot [\ln(A_i) - \ln(R_i)],$$

Jos toinen menetelmä antoi tulokseksi nollan, suhteellinen erotus laskettiin kaavalla.

$$(4) \quad x_i = 100 \cdot [\ln(a_i+1) - \ln(b_i+1)]$$

Jos molemmat menetelmistä antoivat tulokseksi nollan, kyseinen näyte hylättiin.

Tilastollinen käsittely

Suhteellisten erotusten jatkokäsittelyssä oli kolme päävaihetta: aineiston normaalisuuden tutkiminen, näytematriisien välisten erojen tutkiminen ja menetelmien välisten erojen tutkiminen.

Suhteellisten erotusten normaalisuuden tutkimisessa käytettiin graafisista menetelmistä histogrammia ja siihen liitettyä normaalikäyrää sekä normaalijakauman kvantiilikuviota. Normaalisuus testattiin Shapiro-Wilk-testillä.

Näytematriisien suhteellisten erotusten keskiarvojen eroja tutkittiin yksisuuntaisella varianssianalyysillä, kun ryhmiä oli enemmän kuin kaksi. Niissä tapauksissa, joissa osa-aineiston variansseja ei voitu pitää yhtä suurina, käytettiin ei-parametrista Kruskal-Wallisin testiä. Kaksiluokkaisissa ryhmittelyissä keskiarvojen eroja testattiin t-testillä.

Menetelmien vastaavuusvertailu perustui standardin ISO 17994:2004 -ohjeeseen. Niissä osa-aineistoissa, joissa aineiston normaalisuus ei ollut hyväksyttävä, suhteellisen erotuksen poikkeaminen nolasta varmistettiin ei-parametrisella Wilcoxonin Signed Rank -testillä.

3 TULOKSET

3.1 Aineisto

Testattujen näytteiden kokonaismäärä oli 94 kappaletta. Menetelmien tekojärjestys vaihteli toivotulla tavalla: 44 kertaa ISO 9308-1 tehtiin ensin ja 50 kertaa Colilert tehtiin ensimmäisenä. Nämä kaikki näytteet sisältyivät koliformisten bakteerien osalta tähän verifiointiin. 23 näyteistä olivat sellaisia, joissa kummallakaan menetelmällä ei todettu *E. coli* -bakteeria. Täten *E. coli* -bakteerin osalta verifiointiin käytettävissä oleva näytemäärä oli 71 kappaletta. Näistä näytteistä kuusi kappaletta oli sellaisia, joissa vain toinen menetelmä antoi nollasta poikkeavan tuloksen. Tulosten käsittelyn alkuvaiheessa nämäkin näytteet pidettiin mukana aineistossa (muunnettuina kaavan 4 mukaisesti). Aineistoja ryhmiteltäessä kuitenkin todettiin, että nämä muunnetut näytteet heikentävät aineiston normaalisuutta ja ne päätettiin poistaa tarkastelusta. Täten jäljempänä *E. coli* -bakteerin osalta aineistosta on poistettu ne näytteet, joista kummallakaan tai toisella menetelmällä ei todettu *E. coli* -bakteeria ja *E. coli* -aineiston näytteiden lukumäärä on 65 kpl.

Näytematriisina tässä verifiointissa oli kloorattuja verkostovesinäytteitä (38,3 %) ja muita verkostovesinäytteitä (61,7 %). Varsinaisten kloorikäsittelyä siirrostuksien jälkeen kohdemikrobien stressaamiseksi ei tässä verifiointissa tehty. Näytteet olivat peräisin 18 eri vesilaitokselta tai vedenottamolta, noin 16 paikkakunnalta Etelä- ja Keski-Suomesta.

Koska verkostovedet Suomessa eivät normaalitilanteissa sisällä koliformisia bakteereita tai *E. coli* -bakteeria, vesiin siirrostettiin näitä bakteereita sisältäneitä vesimatriiseja. Siirrostena käytettiin jätevettä (47,9 % näytteistä), pintavettä (31,9 % näytteistä) ja pintavedellä saastunutta kaivovettä (20,2 % näytteistä). Jätevesinäytteet olivat peräisin neljältä eri puhdistamolta pääkaupunkiseudulta ja Itä-Suomesta. Pintavedet olivat Helsingin alueen joki- ja purovesiä. Näytematriisin siirrostoiden mukainen jaottelu on esitetty taulukoissa 3 ja 4.

ISO 17994 standardin periaatteet edellyttävät viljelymenetelmien vertailun perustuvan varmistettuihin lukumääriin. Kaikki alustavat positiiviset varmistettiin 72 näytteestä ja osittaista varmistusta käytettiin vain kuudelle näytteelle. Näytteistä 16 oli sellaisia, joista vain ISO 9308-1 -tulokset varmistettiin. Koliformisten bakteerien ja *E. coli* -bakteerin osalta varmistettujen näytteiden lukumäärät on esitetty erikseen taulukoissa 3 ja 4, koska kaikissa tutkituista näytteistä ei alustavasti esiintynyt *E. coli* -bakteeria.

TAULUKKO 3. Koliformiset bakteerit – Aineiston jaottelu näytematriisin, siirrostoiden ja varmistustestityyppien mukaan

| Näytetyyppi | Kaikki varmistettiin | Osittainen varmistus | Osittainen varmistus (vain ISO 9308-1) | Yhteensä | Yhteensä % |
|---|----------------------|----------------------|--|----------|------------|
| Kloorattu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 17 | - | - | 17 | 18,1 |
| Kloorattu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 12 | 1 | 6 | 19 | 20,2 |
| Muu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 25 | - | 3 | 28 | 29,8 |
| Muu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 18 | 5 | 7 | 30 | 31,9 |
| Yhteensä | 72 | 6 | 16 | 94 | 100,0 |

TAULUKKO 4. *Escherichia coli* – Aineiston jaottelu näytematriisin, siirrostoiden ja varmistustestityyppien mukaan

| Näytetyyppi | Kaikki varmistettiin | Osittainen varmistus | Osittainen varmistus (vain ISO 9308-1) | Yhteensä | Yhteensä % |
|---|----------------------|----------------------|--|----------|------------|
| Kloorattu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 16 | - | - | 16 | 24,6 |
| Kloorattu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 1 | - | 6 | 7 | 10,8 |
| Muu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 25 | - | 3 | 28 | 43,1 |
| Muu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 7 | - | 7 | 14 | 21,5 |
| Yhteensä | 49 | - | 16 | 65 | 100,0 |

3.2 Menetelmien herkkyys

ISO 9308-1 -menetelmän perushavainto koliformisten bakteerien ja *Escherichia coli* -bakteerin havaitsemiseksi oli keltaisten pesäkkeiden lukumäärä. Colilert-menetelmän perushavainto koliformisten bakteerien havaitsemiseksi oli 'vain keltaisten' (ONPG-positiivisten) kaivojen lukumäärä ja *Escherichia coli* -bakteerin havaitsemiseksi 'keltaisten, fluoresoivien' (ONPG- ja MUG-positiivisten) kaivojen lukumäärä.

ISO 9308-1 menetelmän ongelmana on huono selektiivisyys ja sitä seuraava runsas taustakasvu, minkä vuoksi taustakasvun määrä LTTC-alustoilla kirjattiin ylös myös tässä verifiointissa. Kaikissa siirrostetuissa näytteistä oli taustakasvua, joko yksittäisinä pesäkkeinä (68,1 % näytteistä) tai häiritsevän runsaasti (31,9 % näytteistä).

Colilert-menetelmässä eristettiin viljelmät alustavien *E. coli* -positiivisten (MUG+, keltaiset, fluoresoivat) kaivojen lisäksi myös alustavista *E. coli* -negatiivisista (MUG-ONPG+, vain keltaiset) kaivoista varmistettavaksi *E. coli* -bakteerin varalta. Alustavan oletuksen mukaan nämä vain keltaiset kaivot sisältävät muita koliformisia bakteereita kuin *E. coli* -bakteeria. Varmistuksilla selvitettiin mahdollista virhenegatiivisten esiintymistä Colilert-menetelmässä. ISO-menetelmässä virhenegatiivisten etsintä ei ollut relevanttia, koska menetelmässä ei alustavasti erotella muita koliformisia bakteereita *E. coli* -bakteereista.

Kolmen ryhmittelytestin (IND, MUG, GAS) perusteella viljelmät jaettiin kahdeksaan (2³) 'biotyypiin' (taulukko 2). Kaikki oksidaasinegatiiviset viljelmät (biotyypit 1–8) katsottiin koliformisiksi bakteereiksi. Testinumeron 29 näytteen kantojen gramvärjäystä varten tehty objektilasi rikkoutui käsittelyssä. Tehtyjen gramtestien perusteella (n = 261) kaikki LTTC-alustalla kasvaneet tyypilliset pesäkkeet olivat tässä aineistossa asianmukaisesti gram-negatiivisia. Täten gram-tuloksia ei huomioitu biotyyppien jaottelussa.

Oksidaasinegatiivisista viljelmistä (IND+MUG+)-tyypit (biotyypit 1 ja 2) kaasun muodostuksesta riippumatta katsottiin *E. coli* -bakteereiksi. Lisäksi menetelmien vastaavuutta tutkittiin käyttäen *E. coli* -bakteerin aikaisemman määrittelyn mukaisia vain indolitestiini (IND+) perustavia varmistustestituloksia (biotyypit 1, 2, 3 ja 4). Alustavasti positiivisten viljelmien tulokset on esitetty yksityiskohtaisesti taulukossa 5.

Varmistettujen havaintojen määrä on pienempi kuin alustavien havaintojen määrä, koska luvuissa on mukana osittain varmistettuja näytteitä 6 kpl ja 16 kpl sellaisia näytteitä, joissa vain ISO 9308-1 -menetelmä varmistettiin. Osittain varmistetuissa näytteissä ei todettu *E. coli* -bakteeria.

Tulosten varmistuvuutta eli menetelmän herkkyyttä mitataan varmistuneiden osuudella testatuista alustavasti positiivisista viljelmistä. Colilert -menetelmällä sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin varmistuvuus (herkkyys) oli niin korkea (100%), että sen mukaan päivittäisessä rutiinityöskentelyssä Colilert-

TAULUKKO 5. Alustavien havaintojen lukumäärät, varmistuksiin otettujen lukumäärät, varmistuneiden frekvenssit eri biotyypeissä (taulukko 2) ja ISO- ja Colilert-menetelmien herkkyys näytteiden lukumäärän ollessa N = 94 ja *E. coli* -bakteerin varmistustestikriteerin ollessa IND+MUG+ (sulussa IND+).

| Alustava havainto | Alustavat | Varmistetut | Varmistuneet/ Biotyyppi | | | | | | | | Yht. | Herkkyys (%) | |
|----------------------------------|-----------|-------------|-------------------------|---|----|---|---|---|----|-----|-------|----------------|------------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | <i>E. coli</i> | Koliformit |
| Colilert, keltaiset fluoresoivat | 634 | 472 | 472 | | | | | | | | 472 | 100,0 | 100,0 |
| Colilert, vain keltaiset | 1 373 | 989 | 8 | | 1 | | | | 28 | 952 | 989 | 0,8* | 100,0 |
| Colilert, yhteensä | 2 007 | 1 461 | 480 | | 1 | | | | 28 | 952 | 1 461 | 32,8 (32,9) | 100,0 |
| ISO 9308-1, keltaiset | 2 032 | 1 979 | 547 | 1 | 17 | 2 | | | 44 | 929 | 1 540 | 27,7 (28,7) | 77,8 |

* Ns. virhenegatiivisten osuus.

menetelmällä ei tarvita varmistuksia vastaavissa näytetyypeissä. Tässä aineistossa virhenegatiivisia löydöksiä saatiin seitsemästä jätevedellä ympätystä näytteestä, joista yhteensä kahdeksan keltaista kaivoa, jotka eivät fluoresoineet, sisälsivät varmistuksen perusteella *E. coli* -bakteeria. Tästä virhenegatiivisten osuudeksi saadulla alle 1 % osuudella (*E. coli* -bakteerin esiintyminen vain keltaisissa kaivoissa) ei voida sanoa olevan käytännön merkitystä.

ISO 9308-1 -menetelmän herkkyys oli koliformisille bakteereille keskimäärin noin 78 % ja *E. coli* -bakteerille noin 28 %, ja ISO-menetelmään kuuluu päivittäisessä rutiinityöskentelyssä varmistustestien käyttö. Herkkyudet vaihtelivat eri näytetyypeissä koliformisten bakteerien osalta välillä 65,2–93,6 % ja *E. coli* -bakteerin osalta välillä 24,9–30,0 %. Kun Colilert-menetelmään kuuluvaa erottelua koliformisten bakteerien *E. coli* -bakteerin välillä (vain keltaiset kaivot vs. keltaiset fluoresoivat) ei otettu huomioon varmistustestituloksia tulkittaessa, saatiin *E. coli* -bakteerin varmistuvuus lähemmäs menetelmällä ISO 9308-1 saatua herkkyystasoa (Colilert yhteensä, herkkyys noin 33 %).

Valtaosa *E. coli* -havainnoista oli tyypillisiä fluoresoivia ja indolipositiivisia, kaasua laktoosista tuottavia bakteereita (biotyyppi 1), eikä varmistustestikriteerillä (IND+MUG+ tai pelkkä IND+) ollut sanottavaa merkitystä testattujen menetelmien herkkyuteen. Biotyyppien 3–7 mukaisia kantoja kertyi yhteensä 92 kpl, joista suurin osa oli kaasua tuottavia, mutta indoli- ja MUG-negatiivisia oksidaasinegatiivisia bakteereita.

3.3 Colilert – ISO 9308-1 -vertailu

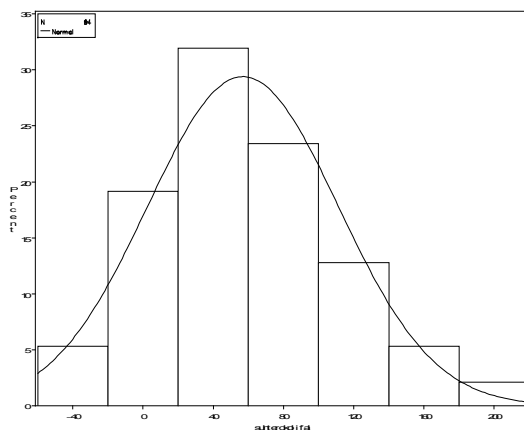
ISO 17994 -standardin mukainen suhteellinen erotus laskettiin alustavista ja varmistetuista Colilert-tuloksista verraten niitä varmistettuihin ISO 9308-1 -tuloksiin. Koska Colilertin varmistuvuus (herkkyys) oli 100 % ja virhenegatiivisten osuus jäi mitättömän pieneksi, seuraavassa on esitetty näytetyypeittäin ryhmitellyt tulokset ainoastaan Colilertin alustavien tuloksien mukaan.

Menetelmien vastaavuutta arvioitaessa tässä vertailussa käytettiin sallitun poikkeaman arvoa $D = 10\%$ ja menetelmiä arvioitiin 1-suuntaisesti. 1-suuntaisessa tarkastelussa vertailtava menetelmä voidaan hyväksyä, kun se antaa vastaavia tai suurempia tuloksia kuin referenssimenetelmä (ISO 17994).

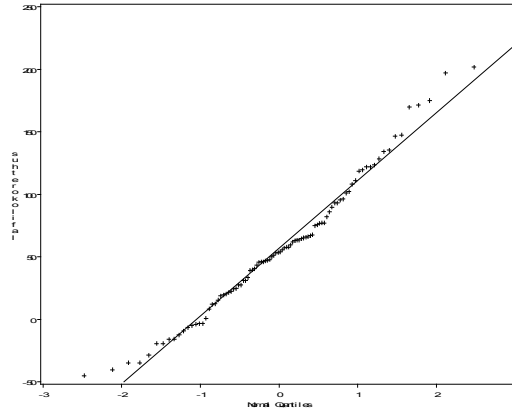
Koliformiset bakteerit

Testimuuttujan normaalisuus oli hyvä koko aineiston tasolla ja hyväksyttävissä yhtä poikkeusta lukuun ottamatta myös kaikissa tutkituissa ryhmissä. Poikkeuksena oli näytetyyppi, jossa klooraamatonta talousvettä oli siirrostettu pintavedellä (Shapiro-Wilk $p = 0.0271$, kun $N = 16$). Kyseisistä näytteistä ei kuitenkaan pystytty havaitsemaan mitään erityistä syytä, miksi ne olisi poistettava aineistosta. Varmuuden vuoksi suhteellisen erotuksen arvoja näistä näytteistä testattiin normaalisuuden oletukseen perustuvan standardin ISO 17994 mukaisen menettelyn lisäksi ei-parametrisella Wilcoxonin Signed Rank testillä.

Kuvioissa 1 ja 2 on esitetty koko koliformisten bakteerien aineisto, johon standardin ISO 17994:2004 mukainen standardianalyysi perustui. Suhteellisten erotusten keskiarvot ja hajonnat eri näytetyyppien mukaisesti jaoteltuna on esitetty taulukossa 6.



KUVIO 1. Koliformiset bakteerit – Histogrammi suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-1) arvojen jakaumasta verrattuna normaalijakaumaan (normaalikäyrä)



KUVIO 2. Koliformiset bakteerit – Suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-1) arvojen jakauman normalisuus normaalijakauman kvanttilikuvion perusteella

TAULUKKO 6. Näytetyypin, siirrostematriisin ja vesimatriisin vaikutus – Colilert ja ISO 9308-1 menetelmien koliformisten bakteerit tulosten suhteellisten erotusten kvantitatiivinen vertailu näytetyypeittäin ISO 17994:n mukaan

| | | N | KA | SD |
|--|---|----|-------|-------|
| Näytetyyppi | Kloorattu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 17 | 53.51 | 50.02 |
| | Kloorattu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 19 | 55.55 | 51.61 |
| | Muu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 28 | 72.95 | 49.67 |
| | Muu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 30 | 44.75 | 60.93 |
| Varianssianalyysin F-arvo: 1.36; p = 0.261, Kruskal Wallis p = 0.101 | | | | |
| Siirrostematriisi | Jätevedellä ympätyt | 45 | 65.61 | 50.15 |
| | Pinta- tai kaivovedellä ympätyt | 49 | 48.94 | 57.18 |
| T-testin t-arvo 1.50; p = 0.138, Wilcoxon p = 0.052 | | | | |
| Vesimatriisi | Kloorattu verkostovesi | 36 | 54.59 | 50.15 |
| | Muu verkostovesi | 58 | 58.36 | 57.09 |
| T-testin t-arvo -0.33; p = 0.746, Wilcoxon p = 0.864 | | | | |
| Varmistustestit | Kaikki varmistettiin | 72 | 54.77 | 53.90 |
| | Osittainen varmistus | 22 | 63.93 | 56.24 |
| T-testin t-arvo -0.69; p = 0.492, Wilcoxon p = 0.394 | | | | |

N = näytteiden lukumäärä, KA = keskiarvo, SD = keskihajonta.

Näytetyyppien, siirrostematriisien, vesimatriisien ja varmistustestityyppien keskiarvojen väliset erot sisäiseen vaihteluun verrattuna eivät olleet merkitseviä ja menetelmien yleistä vastaavuutta arvioitiin seuraavaksi näytetyyppien yhteisten tulosten perusteella. Taulukossa 7 esitetään koko aineiston suhteellisten erotusten keskiarvot hajontalukuineen sekä arvio menetelmien vastaavuudesta koliformisten bakteerien analytiikassa talousvedestä.

TAULUKKO 7. Colilert- ja ISO 9308-1 -menetelmien koliformisten bakteerien tulosten kvantitatiivinen vertailu standardin ISO 17994:2004 mukaan

| N | KA | SD | SE | U | LO | HI | Vastaavuus |
|----|-------|-------|------|-------|-------|-------|--|
| 94 | 56.92 | 54.29 | 5.60 | 11.20 | 45.72 | 68.12 | Vaihtoehtoinen menetelmä antaa suuremmat tulokset kuin referenssimenetelmä |

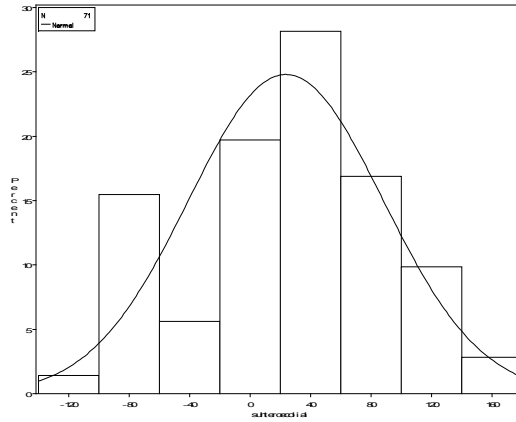
N = näyttemäärä, KA = keskiarvo (painottamaton), SD = keskihajonta, SE = keskiarvon keski-
virhe, U = laajennettu mittausepävarmuus, LO = alempi n. 95% luottamusraja, HI = ylempi n.
95% luottamusraja.

Tämän verifiointin lopputuloksena ISO 17994 -analyysin mukaan Colilert-menetelmän koliformisten bakteerien saanto oli kaikkien näytetyyppien yhteisissä tuloksissa keskimäärin noin 57 % korkeampi kuin referenssimenetelmän.

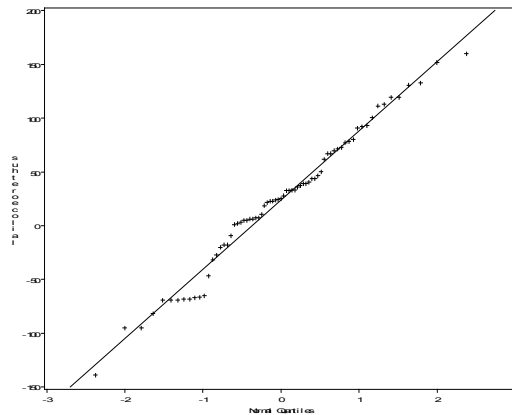
Escherichia coli

ISO 9308-1 -menetelmän mukaan havaituille *E. coli* -bakteereille käytettiin nykyisen määritelmän mukaisten IND+ ja MUG+ varmistustestitulosten antaneiden havaintojen lisäksi *E. coli* -bakteerin vanhaa määritelmää (vain IND+). Testimuuttujan normaalisuus oli hyvä koko aineiston tasolla ja hyväksyttävissä myös kaikissa osa-aineistoissa.

Kuvioissa 3 ja 4 on esitetty tulokset, joihin standardin ISO 17994:2004 mukainen standardianalyysi perustui. Standardin ISO 17994:2004 mukaiset suhteellisen erotuksen keskiarvot ja hajonnat eri näytetyyppien ja ISO 9308-1 tuloksien varmistustyyppien mukaisesti jaoteltuna on esitetty taulukossa 8.



KUVIO 3. *Escherichia coli* (IND+MUG+) – Histogrammi suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-1) arvojen jakaumasta verrattuna normaalijakaumaan (normaalikäyrä)



KUVIO 4. *Escherichia coli* (IND+MUG+) – Suhteellisen erotuksen (Colilert vs. ISO 9308-1) arvojen jakauman normalisuus normaalijakauman kvanttilikuvion perusteella

TAULUKKO 8. Näytetyypin, siirrostematriisin ja vesimatriisin vaikutus – Colilert ja ISO 9308-1 menetelmien *E. coli* (IND+MUG+) tulosten suhteellisten erotusten kvantitatiivinen vertailu näytetyypeittäin ISO 17994:n mukaan.

| | Kaikki varmistettiin | | | Osittainen varmistus | | | Yhteensä | | |
|---|----------------------|-------|-------|----------------------|--------|-------|----------|--------|-------|
| | N | KA | SD | N | KA | SD | N | KA | SD |
| Näytetyyppi | | | | | | | | | |
| Kloorattu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 16 | 33.05 | 48.44 | 0 | - | - | 16 | 33.05 | 48.44 |
| Kloorattu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 1 | 71.31 | - | 6 | -21.01 | 87.40 | 7 | -7.82 | 87.08 |
| Muu verkostovesi, jätevedellä ympätty | 25 | 59.83 | 51.51 | 3 | 18.32 | 34.18 | 28 | 55.39 | 51.15 |
| Muu verkostovesi, pinta- tai kaivovedellä ympätty | 7 | -8.90 | 41.85 | 7 | -16.34 | 42.20 | 14 | -12.62 | 40.56 |
| Kruskal-Wallis p = 0.002 | | | | | | | | | |
| Siirrosteen tyyppi | | | | | | | | | |
| Jätevedellä ympätyt | 41 | 49.38 | 51.45 | 3 | 18.32 | 34.18 | 44 | 47.26 | 50.79 |
| Pinta- tai kaivovedellä ympätyt | 8 | 1.12 | 48.01 | 13 | -18.50 | 63.87 | 21 | -11.02 | 57.88 |
| T-testin t-arvo 4.14; p < 0.001 | | | | | | | | | |
| Vesimatriisi | | | | | | | | | |
| Kloorattu verkostovesi | 17 | 35.30 | 47.81 | 6 | -21.01 | 87.40 | 23 | 20.61 | 63.54 |
| Muu verkostovesi | 32 | 44.80 | 56.81 | 10 | -5.94 | 41.56 | 42 | 32.72 | 57.42 |
| T-testin t-arvo -0.78; p = 0.437 | | | | | | | | | |

N = näytteiden lukumäärä, KA = keskiarvo, SD = keskihajonta

Pinta- ja kaivovedellä siirrostetut näytteet olivat jätevesillä ympättyjä näytteitä useammin vain osittain varmistettuja (41/49 ”kaikki varmistettiin” -ryhmästä ovat jätevedellä ympättyjä ja 13/16 ”osittainen varmistus” -ryhmästä ovat pinta- tai kaivovedellä ympättyjä). Tässä *E. coli* -aineistossa osittainen varmistus itse asiassa tarkoitti sitä, että Colilert-tuloksia ei varmistettu lainkaan ja ISO 9308-1 -tulokset varmistettiin osittain. Siirrosteen tyyppi (jätevesi vs. pinta- tai kaivovesi) vaikutti merkittävästi menetelmien välisen suhteellisen erotuksen keskiarvoon. Klooratun ja muun verkostoveden välillä suhteellisen erotuksen keskiarvo ei poikennut merkittävästi.

ISO 17994 analyysin mukaan Colilert menetelmän *E. coli*-saanto oli kaikkien näytetyyppien yhteisissä tuloksissa keskimäärin 28 % ja 26 % korkeampi kuin referenssimenetelmän, kun varmistustestikriteerinä oli IND+MUG+ ja pelkkä IND+ (taulukko 9). Koko aineistoa ei kuitenkaan voitu täysin varauksetta yhdistää, sillä sekä varmistustestityypin (kaikki varmistettiin vs. osittainen varmistus) että siirrostematriisiin (jätevesi vs. pinta- tai kaivovesi) mukaisesti ryhmiteltynä suhteellisen erotuksen keskiarvot poikkesivat tilastollisesti merkitsevästi toisistaan.

TAULUKKO 9. Colilert- ja ISO 9308-1 -menetelmien *E. coli* -tulosten kvantitatiivinen vertailu standardin ISO 17994:2004 mukaan. Kuuden näytetyypin yhteinen tulos

| Varm. kriteeri | Aineiston ryhmittely | N | KA | SD | SE | U | LO | HI | Vastaavuus* |
|----------------|----------------------------------|----|--------|-------|-------|-------|--------|-------|----------------|
| IND+MUG+ | Kaikki varmistettiin | 49 | 41.50 | 53.54 | 7.65 | 15.30 | 26.20 | 56.80 | + |
| | Osittainen varmistus | 16 | -11.59 | 60.33 | 15.08 | 30.16 | -41.76 | 18.57 | Tulos epävarma |
| | T-testin t-arvo 3.34; p = 0.001 | | | | | | | | |
| | Jätevedellä ympätyt | 44 | 47.26 | 50.79 | 7.66 | 15.31 | 31.95 | 62.58 | + |
| | Pinta- tai kaivo-vedellä ympätyt | 21 | -11.02 | 57.88 | 12.63 | 25.26 | -36.28 | 14.24 | Tulos epävarma |
| | T-testin t-arvo 4.14; p < 0.001 | | | | | | | | |
| | Yhteensä | 65 | 28.43 | 59.45 | 7.37 | 14.75 | 13.68 | 43.18 | + |
| vain IND+ | Kaikki varmistettiin | 49 | 41.08 | 53.27 | 7.61 | 15.22 | 25.86 | 56.30 | + |
| | Osittainen varmistus | 16 | -21.21 | 72.71 | 18.18 | 36.35 | -57.56 | 15.15 | Tulos epävarma |
| | T-testin t-arvo 3.70; p = 0.001 | | | | | | | | |
| | Jätevedellä ympätyt | 44 | 46.80 | 50.52 | 7.62 | 15.23 | 31.57 | 62.03 | + |
| | Pinta- tai kaivo-vedellä ympätyt | 21 | -18.35 | 67.91 | 14.82 | 29.64 | -47.98 | 11.29 | Tulos epävarma |
| | T-testin t-arvo 4.34; p < 0.001 | | | | | | | | |
| | Yhteensä | 65 | 25.75 | 64.02 | 7.94 | 15.88 | 9.87 | 41.63 | + |

* +; vaihtoehtoinen menetelmä antaa suuremmat tulokset kuin referenssimenetelmä.

N = näytemäärä, KA = keskiarvo (painottamaton), SD = keskihajonta, SE = keskiarvon keskivirhe, U = laajennettu mittausepävarmuus, LO = alempi n. 95% luottamusraja, HI = ylempi n. 95% luottamusraja.

Tässä verifiointissa arvioitiin myös ISO 9308-1 menetelmässä esiintyvän taustakasvun määrää ja häiritsevyyttä. *E. coli* -aineiston näytteistä 40 kpl (61,5 %) olivat sellaisia, että ISO 9308-1 menetelmässä todettiin ainoastaan yksittäisiä taustapesäkkeitä ja 25 kpl (38,5 %) sellaisia, joissa todettiin runsas häiritsevä tausta. Pintatai kaivovedellä ympätyissä näytteiden taustakasvuna todettiin pääasiassa vain yksittäisiä pesäkkeitä (90,5 %) ja osittaiset varmistukset tehtiin pääasiassa sellaisilta maljoilta, joilla oli taustakasvua vain yksittäisiä pesäkkeitä (87,5 %). Jätevesillä siirrostetut näytteet ja näytteet, joissa kaikki varmistettiin, jakautuivat tasaisesti molempiin luokkiin ISO 9308-1 -menetelmän taustakasvun suhteen. Taulukossa 10 on esitetty menetelmien välinen suhteellinen erotus luokiteltuna LTTC-taustakasvun mukaan. Colilert-menetelmä antoi keskimäärin suurempia tuloksia suhteessa referenssimenetelmään niillä näytteillä, joissa todettiin runsas ja häiritsevä tausta.

TAULUKKO 10. Taustakasvun vaikutus LTTC-alustalla – Colilert ja ISO 9308-1 menetelmien *E. coli* (IND+MUG+) -tulosten suhteellisten erotusten kvantitatiivinen vertailu siirrost- ja varmistustyyppien mukaisesti jaoteltuna

| | Yksittäisiä pesäkkeitä | | | Runsas ja häiritsevä tausta | | |
|--|------------------------|--------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| | N | KA | SD | N | KA | SD |
| Jätevedellä siirrostetut näytteet | 21 | 41.63 | 58.61 | 23 | 52.40 | 43.14 |
| Pinta- ja kaivovedellä siirrostetut näytteet | 19 | -15.78 | 58.87 | 2 | 34.20 | 9.04 |
| Kaikki varmistetaan | 26 | 31.86 | 60.50 | 23 | 52.40 | 43.14 |
| Osittainen varmistus | 14 | -18.13 | 61.84 | 2 | 34.20 | 9.04 |

Koska osittainen varmistus näytti vaikuttavan menetelmien väliseen eroon *E. coli* -tuloksissa, seuraavassa on esitetty aineisto myös niiltä osin, joissa sekä Colilert-menetelmässä että ISO 9308-1 menetelmässä kaikki alustavat havainnot on varmistettu (taulukko 11). Tämän osa-aineiston perusteella Colilert-menetelmä antaa 43,5 % suurempia tuloksia verrattuna referenssimenetelmään ISO 9308-1.

TAULUKKO 11. Colilert- ja ISO 9308-1 -menetelmien kokonaan varmistettujen *E. coli* -tulosten kvantitatiivinen vertailu standardin ISO 17994:2004 mukaan

| Varmistus-kriteeri | N | KA | SD | SE | U | LO | HI | Vastaavuus |
|--------------------|----|-------|-------|------|-------|-------|-------|--|
| IND+MUG+ | 49 | 43.51 | 52.62 | 7.52 | 15.03 | 28.47 | 58.54 | Vaihtoehtoinen menetelmä antaa suuremmat tulokset kuin referenssimenetelmä |
| vain IND+ | 49 | 43.48 | 52.14 | 7.45 | 14.90 | 28.59 | 58.38 | Vaihtoehtoinen menetelmä antaa suuremmat tulokset kuin referenssimenetelmä |

N = näytemäärä, KA = keskiarvo (painottamaton), SD = keskihajonta, SE = keskiarvon keskivirhe, U = laajennettu mittausepävarmuus, LO = alempi n. 95% luottamusraja, HI = ylempi n. 95% luottamusraja.

3.4 Suomen verifiointitulokset suhteessa Espanjan ja Ison-Britannian aiempiin tuloksiin

Taulukossa 12 on esitetty tässä verifiointitutkimuksessa saadut tulokset yhdessä aikaisemmin Espanjassa ja Isossa-Britanniassa saatujen tulosten kanssa. Vertailun vuoksi kaikista esitetään molemmilla menetelmillä varmistetut tulokset. Suomen verifioinnin tulokset vastaavat hyvin aikaisemmin Espanjassa ja Isossa-Britanniassa saatuja tuloksia. Koliformisten bakteerien osalta Suomen aineistossa Colilert-menetelmän ero suhteessa referenssimenetelmään oli hieman pienempi kuin Ison-Britannian aineistossa. Muilta osin aineistojen suhteellisten erotusten keskiarvojen vaihteluvälit menivät limittäin eli tulokset eivät poikenneet toisistaan merkittävästi. Suomen aineiston Espanjan ja Ison-Britannian aineistoja hieman suurempaa vaihtelua selittää verifiointiaineiston pienuus suhteessa varsinaisiin vertailututkimusaineistoihin.

TAULUKKO 12. Verifioinnissa saadut tulokset (suhteellisten erotusten keskiarvo ja vaihteluväli, %) suhteessa Espanjan ja Ison-Britannian aikaisemmin julkaisemiin tuloksiin

| | Koliformiset bakteerit | | | <i>E. coli</i> | | |
|--------------------------|------------------------|------|-----------|----------------|------|-----------|
| | N | KA | LO–HI | N | KA | LO–HI |
| Espanjan aineisto | 333 | 66.1 | 58.3–74.0 | 256 | 20.7 | 8.0–33.4 |
| Ison-Britannian aineisto | 445 | 79.1 | 69.1–89.2 | 465 | 23.5 | 13.6–33.3 |
| Suomen verifiointi | 94 | 56.9 | 45.7–68.1 | 65 | 28.4 | 13.7–43.2 |

Aineistojen välillä on mahdollisesti eroavaisuuksia näytematriisien välisissä suhteissa, mutta Espanjan ja Ison-Britannian vertailututkimuksien raporteissa ei esitetty analyysijä näytematriisien välillä. Täten Suomen verifoinnissa saatuja näytematriisien välisiä tuloksia ei voi verrata aikaisemmin saatuihin tuloksiin. Aineistot poikkeavat myös varmistustestikriteereiltään jonkin verran, mutta ovat silti vertailukelpoisia, sillä Suomen vertailussa tulokset laskettiin myös erilaisilla varmistuskriteerien variaatioilla.

Vesityyppi Suomessa on todennäköisesti erilainen kuin Espanjassa ja Isossa-Britanniassa, samoin kuin jäännöskloorin pitoisuustasot eri maissa. Toisaalta ero esiintyy varmasti myös Espanjan ja Ison-Britannian välillä, ja silti molempien maiden menetelmävertailuissa on saatu hyvin yhteneväisiä tuloksia. Tämän vuoksi tässä verifoinnissa ei tarkemmin paneuduttu maiden välisiin vesityyppien eroihin. Alustavassa kloorin pitoisuustasojen selvittelyssä kävi ilmi, että keskimääräisiä jäännösklooritasoja ei ole ainakaan Suomessa keskitetysti saatavilla, vaan tiedot pitäisi hankkia kultakin vesilaitokselta erikseen. Tämä olisi kohtuuttoman suuri työtaakka suhteessa saatavaan hyötyyn nähden, sillä Suomessa on yli 1 000 vesilaitosta tai vedenottamo.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Tämän Suomen verifiointiaineiston perusteella Colilert-menetelmä antaa 57 % suurempia koliformisten bakteerien tuloksia kuin referenssimenetelmä SFS-EN ISO 9308-1. *E. coli* -bakteerin osalta Colilert-menetelmä antaa tämän verifioinnin tulosten perusteella keskimäärin 28 % suurempia tuloksia kuin referenssimenetelmä, kun varmistuskriteerinä on indoli- ja β -glukuronidaasipositiivisuus. Sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin osalta Colilert-menetelmä antaa keskimäärin suurempia tuloksia kuin referenssimenetelmä ja on siten vähintään yhtä luotettava kuin referenssimenetelmä.

Tässä verifioinnissa saadut varmistuvuudet (herkkyydet) Colilert- ja ISO 9308-1 -menetelmille ovat vastaavaa tasoa kuin mitä kyseisille menetelmille on aikaisemmissa tutkimuksissa raportoitu. Vastaavasti kuin Suomen aineistossa, myös Espanjan aineistossa Colilert-menetelmällä ei todettu lainkaan oksidaasipositiivisia viljelmiä.

E. coli -aineistossa menetelmien välisen suhteellisen erotuksen keskiarvo oli erilainen riippuen siitä, tarkasteltiin jätevedellä vai pinta- tai kaivovedellä siirrostettuja näytteitä. Siirrostematriisien välillä havaittiin myös ero menetelmän ISO 9308-1 taustakasvun määrässä. Pinta- ja kaivovedellä siirrostetuissa näytteissä ei esiintynyt juuri lainkaan runsasta ja häiritsevää taustakasvua LTTC-alustalla ja näissä näytteissä ISO 9308-1 -menetelmä antoi keskimäärin suurempia tuloksia kuin Colilert-menetelmä. Jätevedellä siirrostetut näytteet sen sijaan jakaantuivat tasaisesti LTTC-taustakasvun mukaan, ja näillä näytteillä Colilert-menetelmä antoi keskimäärin suurempia tuloksia kuin ISO 9308-1 -menetelmä.

Virhenegatiivisten osuus oli tässä verifioinnissa selvästi pienempi kuin aikaisemmin Suomesta raportoiduissa tutkimuksissa (Pitkänen *et al.*, 2007; Pitkänen *et al.*, 2008). Tämä johtunee siitä, että nykyisin Suomessa osataan kiinnittää huomiota virhenegatiivisiin ja niitä aktiivisesti vältetään laskemalla *E. coli* -positiivisiksi myös heikosti fluoresoivat kaivot. Fluoresenssin havaitsemista myös merkittävästi auttaa pimeä lukukammio yhdistettynä tehokkaan UV-lampun käyttöön.

Talouksveden saastuminen jätevedellä aiheuttaa veden käyttäjille välittömän terveysriskin ja siten on hyvä, että tämänkaltaisilla näytteillä Colilert-menetelmän voidaan osoittaa toimivan *E. coli* -bakteerin havaitsemiseksi vähintään yhtä hyvin tai paremmin kuin referenssimenetelmä. Sen sijaan ulosteperäisesti saastuneita pinta- tai kaivovesiä tutkittaessa Colilert-menetelmän vastaavuus suhteessa referenssimenetelmään jäi tässä verifioinnissa epävarmaksi. Molempia tapauksissa Suomen talousvesiä tutkittaessa voi tulla vastaan, ja molemmat siirrostetyypit sisällytettiin lopulliseen arviointiin.

Suomalaisessa uimavesimenetelmien vertailututkimuksessa vuonna 2006 jätevedellä siirrostetuilla uimavesillä Colilert-menetelmän saanto suhteessa pienen

mittakaavan MPN menetelmään ISO 9308-3 oli -2,1 %. Luontaisesti *E. coli* -bakteeria sisältäneitä uimavesinäytteitä tutkittaessa tämä saanto oli -13,8 %. Espanjalaisessa vertailututkimuksessa kloorattuja vesiä tutkittaessa siirrostena käytettiin yksinomaan jätevesiä, mutta klooraamattomille vesille siirrostena käytettiin myös ulosteperäisesti kontaminoituneita pintavesiä ja pohjavesiä. Espanjalaisen aineiston näytteistä 96 / 340 (28 %) oli pinta- tai pohjavedellä siirrostettuja, mutta raportissa ei esitetä suhteellisen erotuksen arvoja näytetyypeittäin ryhmiteltynä. Ison-Britannian aineistossa siirrostena käytettiin jätevesien lisäksi joki- ja järvesiä ynnä muita talousvesien raakavesiä, mutta tässäkin raportissa ei esitä suhteellisen erotuksen keskiarvoja koko aineistosta näytetyypeittäin jaoteltuna.

Tässä verifoinnissa tutkittiin sekä kloorattuja että klooraamattomia talousvesinäytteitä. Varsinaista mikrobien stressausta kloorilla siirrostuksen jälkeen ei kuitenkaan tehty, vaan haluttiin lähinnä katsoa näytteessä ennen siirrostuksia olevan taustamikrobiston vaikutusta. Mukana aineistossa oli mm. Helsingin, Kouvolan, Tampereen ja Kuopion kaupunkien verkostovesiä.

Colilert-menetelmää käyttäen on mahdollista saada ajan säästöä niissä tilanteissa, joissa on aiheutta epäillä veden mikrobiologista saastumista. Colilert-menetelmää käytettäessä sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin tulokset valmistuvat 18 tunnin kuluttua analyysin aloittamisesta. Voimakkaan ulostesaastumisen yhteydessä alustavat viitteet näistä mikrobeista voidaan saada tällä menetelmällä jo muutamien tuntien kuluttua analyysin aloittamisesta. Nopeuden tärkeys korostuu niissä tilanteissa, kun tehdään päätöksiä vedenkäytön rajoituksista ja veden puhtauden varmistavista toimenpiteistä.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

- Tässä hankkeessa tuotettiin verifiointiaineisto Colilert®-18 Quanti-Tray -menetelmän (IDEXX Laboratories) luotettavuuden ja soveltuvuuden testaamiseksi *Escherichia coli* -bakteerin ja koliformisten bakteerien tutkimiseen talousveden laadun viranomaisvalvonnassa Suomessa.
- Aineiston tarkastelun perusteella Colilert-menetelmä antaa vähintään yhtä luotettavia tuloksia kuin referenssimenetelmä SFS-EN ISO 9308-1 ja Colilert-menetelmää voi suositella käytettäväksi standardimenetelmien SFS-EN ISO 9308-1 ja SFS 3016 rinnalla talousveden viranomaisvalvonnassa Suomessa.
- Colilert-menetelmää käytettäessä on otettava huomioon, että tässä verifioinnissa todettu vastaavuus pätee nimenomaan Colilert®-18 -reagenssia käytettäessä inkubointiolosuhteiden ollessa (36 ± 2) °C, 18–21 tuntia.
- Colilert-menetelmään ei sisälly varmistustestejä rutiinityöskentelyssä. Tässä verifioinnissa varmistettiin, että varmistustesteille ei ole tarvetta, sillä kaikki alustavat havainnot varmistuivat sekä koliformisten bakteerien että *E. coli* -bakteerin osalta (herkkyys 100 %).
- Tämän Suomen verifiointiaineiston perusteella Colilert-menetelmä antaa noin 57 % suurempia koliformisten bakteerien tuloksia kuin referenssimenetelmä. Colilert-menetelmää käytettäessä on siten huomioitava, että se antaa standardimenetelmiä SFS-EN ISO 9308-1 ja SFS 3016 useammin koliformisten bakteerien osalta positiivisia tuloksia.
- *E. coli* -bakteerin osalta Colilert-menetelmä antoi tässä verifioinnissa keskimäärin 28 % suurempia tuloksia kuin referenssimenetelmä SFS-EN ISO 9308-1, kun varmistuskriteerinä pidettiin indoli- ja β -glukuronidaasipositiivisuutta. Virhenegatiivisten *E. coli* -tulosten välttämiseksi fluoresenssireaktion lukeminen on suoritettava erityisessä lukukammiossa tai pimiössä ja vähäenkin fluoresenssi on tulkittava positiiviseksi reaktioksi.
- Colilert-menetelmä osoitti toimivuutensa erityisesti niillä runsaasti taustamikrobistoa sisältävillä näytteillä, joita analysoitaessa SFS-EN ISO 9308-1 -menetelmällä on useissa aikaisemmissa tutkimuksissa havaittu ongelmia. Erittäin puhtaiden ja kloorattujen vesien tutkimiseen SFS-EN ISO 9308-1 -menetelmä saattaa silti edelleen olla herkin ja paras menetelmä.
- Ongelmatilanteita selvitellessä on hyödyllistä, jos laboratoriolalla on käytössään Colilert-menetelmän lisäksi myös kalvosuodatusmenetelmä, jolla voidaan tutkia myös suurempia vesitilavuuksia kuin säädöstenmukainen 100 ml.

Kirjallisuus

- Anonymous. (2004) Equivalency testing of Colilert Quantitray compared to Lactose TTC agar with sodium heptadecylsulphate (ISO 9308-1:2000) for the enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* from drinking water. A submission of data by the UK.
- Bej, A. K., McCarty, S. C. and Atlas, R. M., 1991. Detection of Coliform Bacteria and *Escherichia-Coli* by Multiplex Polymerase Chain-Reaction - Comparison with Defined Substrate and Plating Methods for Water-Quality Monitoring. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2429–2432.
- Guidance Note. Guidance on submissions on comparison of alternative microbiological methods under the European Union directive on drinking water. 15.4.2005, European Microbiology Advisory Group (EMAG/EGM).
- Hatakka, M., Hartikainen T. ja Rapala, J. (2008) Eviran laboratorioselvitys 2008. Eviran julkaisuja 6/2008. Ladattavissa internetistä: <http://www.evira.fi/uploads/WebShopFiles/1220857012640.pdf>.
- Intralaboratory equivalence study. According to ISO 17994: Colilert-18 Vs ISO 9308-1. Verification. Draft 3, 2/07/08, IDEXX, Maine, USA
- Pitkänen, T., Kalso, S., Rapala, J., Koskentalo, H., Tuhkalainen, T., Luoma, A., Laamanen, V., Airaksinen, P. and Niemelä, S.I. (2008) *Escherichia coli* METHODS FOR BATHING WATERS – Results of a Finnish equivalence trial. A report to European Commission. Suomenkielinen versio ladattavissa internetistä: <http://www.ktl.fi/portal/3102>.
- Pitkänen, T., Miettinen, I. T., Paakkari, P., Heimonen-Tanski, H., Paulin, L. and Hänninen, M.-L. (2007) Comparison of media for enumeration of coliform bacteria and *Escherichia coli* in non-disinfected water. *Journal of Microbiological Methods* 68:522–529.
- Ribas, F., Tusell, E., Allaert Vandevenne, C. and Niemelä, S.I. (2006) Study to verify equivalence between three alternative methods and the TTC Tergitol 7 lactose agar reference method (ISO 9308-1:2000) in the counting of coliform bacteria and *Escherichia coli* in water. Report addressed to the Ministry of Health and Consumer Affairs, Madrid, Spain.
- Sosiaali- ja terveysministeriön asetus 461/2000 talousveden laatuvaatimuksista ja valvontatutkimuksista. Helsinki, 19.5.2000.
- SFS 3016 (2001) Veden laatu – Veden koliformisten bakteerien kokonaismäärän määrittäminen kalvosuodatusmenetelmällä. Suomen standardisoimisliitto SFS.
- SFS-EN ISO 9308-1 (2001) Veden laatu – *Escherichia coli* ja koliformisten bakteerien toteaminen ja laskeminen - Osa 1: Kalvosuodatusmenetelmä. Suomen standardisoimisliitto SFS.
- SFS-EN ISO 17994 (2004) Veden laatu – Kriteerit mikrobiologisten menetelmien vastaavuuden osoittamiseksi. Suomen standardisoimisliitto SFS.



RAPORTTI-sarjassa aiemmin ilmestyneet

2009

Päivi Hämäläinen, Jarkko Reponen, Ilkka Winblad. eHealth of Finland: Check point 2008.
Report 1/2009 Tilausno RAP001_2009

Satu Helakorpi, Meri Paavola, Ritva Prättälä, Antti Uutela. Suomalaisen aikuisväestön terveystäytyminen ja terveys, kevät 2008
Raportti 2/2009 Tilausno 002_2009

Unto Häkkinen, Lien Nguyen, Markku Pekurinen, Mikko Peltola. Tutkimus terveyden- ja vanhuksenhuollon tarve- ja valtionosuuskriteereistä
Raportti 3/2009 Tilausno RAP003_2009

Elina Pylkkänen, Antti Väisänen. Tutkimus sosiaalihuollon valtionosuusperusteista
Raportti 4/2009 Tilausno RAP004_2009

Marja Holmila, Katariina Warpenius, Leena Warsell, Minna Kesänen, Irmeli Tamminen. Paikallinen alkoholipolitiikka
Raportti 5/2009 Tilausno RAP005_2009

Leena Metso, Salme Ahlström, Petri Huhtanen, Minna Leppänen, Eija Pietilä. Nuorten päihteiden käyttö Suomessa 1995–2007
Raportti 6/2009 Tilausno RAP006_2009

Helena Aldén-Nieminen, Susanna Rautio, Satu Männistö, Elina Laitalainen, Merja Suominen, Ritva Prättälä. Ikääntyneiden suomalaisten ateriointi
Raportti 7/2009

Laura Suomalainen, Henna Haravuori, Noora Berg, Olli Kiviruusu, Mauri Marttunen. Jokelan koulukskuksen ampumissurmille altistuneiden oppilaiden selviytyminen, tuki ja hoito
Raportti 8/2009 Tilausno RAP008_2009

Tarja Heino. Family Group Conference from a Chbild Perspective
Report 9/2009 Tilausno RAP009_2009

Persephone Doupi. National Reporting Systems for Patient Safety Incidents
Report 13/2009 Tilausno RAP013_2009

THL. Rakenteet, avuttomuus ja lainsäädäntö
Raportti 14/2009 Tilausno RAP014_2009